TheraScreen®

molecular diagnostics
for personalised medicine

TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit

Für den Nachweis von sieben (7) Mutationen im K-RAS-Gen

Zur Verwendung mit dem Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System (System II)
(Katalognr.: 05015278001)
und dem Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System
(Artikelnummer: 4351105)

Enthält das Benutzerhandbuch für die LightCycler® Adapt Software v1.1 von Roche Diagnostics (Katalognr. 05474914001) für das TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit CE-IVD

Gebrauchsanleitung

Produktcodes

Kit-Umfang	DxS-Produktcode	Roche Diagnostics-Bestellnummer
20 Reaktionen	KR-21	05366216190
80 Reaktionen	KR-22	05366224190

Dokumentversion: DU001g

Datum der Überarbeitung: Mai 2009

Bei -18°C bis -25°C aufbewahren!

CE

DxS Diagnostic Innovations

Inhalt

1. Verwendungszweck/Anwendungsgebiete....3
2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests....3
3. Technologische Grundlagen....4
4. Reagenzien....6
5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN....7
6. Lagerung, Haltbarkeit und Transportbedingungen....9
7. System....9
8. Proben....9
9. K-RAS-Mutationsnachweisprotokoll....14
10. Einschränkungen des Tests....26
11. Assay-Leistungsmerkmale....28
12. Technische Unterstützung....36
13. Hersteller- und Händlerangaben....37
14. Datum der letzten Überarbeitung....37
15. Literatur....38
Hinweise für den Käufer....40

⚠ **WICHTIG: Lesen Sie diese Gebrauchsanweisung aufmerksam durch und machen Sie sich vor dem Gebrauch mit allen Komponenten des K-RAS Kits vertraut.**

1. Verwendungszweck/Anwendungsgebiete

Verwendungszweck

Das DxS TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit (K-RAS Kit) ist ein *In-vitro*-Diagnosetest zur Detektion von sieben somatischen Mutationen im K-RAS-Onkogen, der eine qualitative Auswertung des Mutationsstatus ermöglicht. Das K-RAS Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung an DNA-Proben verwendet werden, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem kolorektalen Gewebe extrahiert wurden.

Anwendungsgebiete

Die Ergebnisse des K-RAS Kits dienen der Unterstützung von Ärzten bei der Identifizierung von Patienten mit Kolorektalkrebs, die von einer Anti-EGFR-Therapie (Epidermal Growth Factor Receptor), wie zum Beispiel mit Panitumumab oder Cetuximab, möglicherweise nicht profitieren.

Das K-RAS Kit ist nicht zur Diagnose von Kolorektalkrebs bestimmt, sondern dient als Ergänzung zu anderen relevanten Prognosefaktoren, anhand derer auf Grundlage des Mutationsstatus geeignete Patienten für die Anti-EGFR-Therapie ausgewählt werden. Der Mutationsstatus des Patienten wird zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren von einem Arzt beurteilt, damit eine Therapieentscheidung getroffen werden kann. Therapieentscheidungen für Krebspatienten dürfen keinesfalls ausschließlich auf dem K-RAS-Mutationsstatus beruhen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Das K-RAS Kit ist ein mit dem CE-Zeichen versehenes Diagnostikum, das der Richtlinie 98/79/EG der Europäischen Union über *In-vitro*-Diagnostika entspricht.

In menschlichen Karzinomen treten häufig Mutationen des K-RAS-Onkogens auf[1-4]. Patienten mit metastasiertem Kolorektalkrebs, bei denen eine Mutation des K-RAS-Gens vorliegt, sprechen auf bestimmte Krebstherapien mit EGFR-Blockern nicht an[5-10][14-21].

Die Detektion von sieben Mutationen im K-RAS-Gen kann in einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA in einem Echtzeit-PCR-Assay unter Verwendung der DxS Scorpions®-Technologie erfolgen. Diese Methode ist äußerst selektiv. Unter der Voraussetzung, dass genug DNA-Kopien vorhanden sind, kann etwa 1 % Mutation in einem Hintergrund aus genomischer Wildtyp-DNA erkannt werden.

Mit dem K-RAS Kit lassen sich sieben K-RAS-Mutationen im Codon 12 und 13 des K-RAS-Onkogens nachweisen; siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Mit dem DxS-Kit nachgewiesene K-RAS-Mutationen

Die COSMIC-IDs wurden dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* entnommen.
http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/

Mutation	Basenveränderung	Cosmic-ID
Gly12Ala	(GGT>GCT)	522
Gly12Asp	(GGT>GAT)	521
Gly12Arg	(GGT>CGT)	518
Gly12Cys	(GGT>TGT)	516
Gly12Ser	(GGT>AGT)	517
Gly12Val	(GGT>GTT)	520
Gly13Asp	(GGC>GAC)	532

3. Technologische Grundlagen

Das K-RAS Kit weist Mutationen in Echtzeit-PCR-Assays mit Hilfe der Kombination zweier Technologien nach: ARMS® und Scorpions® [11, 12, 13].

ARMS

Die ARMS-Technologie dient zur allel- oder mutationsspezifischen Amplifikation. Die *Taq*-DNA-Polymerase kann zwischen einer Übereinstimmung und einer Nichtübereinstimmung am 3'-Ende eines PCR-Primers äußerst effektiv unterscheiden. Spezifische mutierte Sequenzen können aus folgenden Gründen selbst in Proben, bei denen die Mehrzahl der Sequenzen die Mutation nicht aufweist, selektiv amplifiziert werden:

- Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz.
- Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, wird die Amplifikation nur im Hintergrund auf niedrigem Niveau durchgeführt.

Scorpions

Die Detektion der Amplifikation wird mit Hilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die einen PCR-Primer enthalten, der kovalent mit einer Sonde verbunden ist. Das Fluorophor in dieser Sonde interagiert mit einem Quencher, der auch in die Sonde eingebunden ist und die Fluoreszenz reduziert.

Wenn sich während einer PCR-Reaktion die Sonde an das Amplifikat bindet, wird das Fluorophor vom Quencher getrennt. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsröhrchen.

Datenanalyse: ΔCt-Methode

Bei den Scorpions-Echtzeitassays werden die zu Reaktionsbeginn vorhandenen Zielmoleküle anhand der Anzahl von PCR-Zyklen gemessen, die zur Detektion eines fluoreszierenden Signals über einem Hintergrundsignal erforderlich sind. Der Punkt, an dem das Signal über der Hintergrundfluoreszenz erkannt wird, ist der so genannte Zyklusschwellenwert (*Cycle Threshold*, Ct).

Die ΔCt-Werte der Probe werden als Differenz zwischen dem Mutationsassay-Ct und dem Kontrollassay-Ct derselben Probe berechnet. Proben werden als positiv eingestuft, wenn das ΔCt-Ergebnis unter dem 1 %-ΔCt-Wert des Assays liegt.

Über diesem Wert besteht die Möglichkeit, dass die Probe weniger als 1 % Mutation enthält (außerhalb der Assay-Grenzwerte) oder mutationsnegativ ist.

Bei Verwendung von ARMS-Primern kann möglicherweise ineffizientes Priming erfolgen, das bei DNA, die keine Mutation enthält, einen sehr späten Hintergrund-Ct ergibt. Alle aus der Hintergrundamplifikation berechneten ΔCt-Werte liegen über den 1 %-ΔCt-Werten; die Probe wird demnach als mutationsnegativ eingestuft.

Das K-RAS Kit ist mit der CE-Kennzeichnung für die Anwendung als *In-vitro*-Diagnostikum auf dem Roche Diagnostics LightCycler® 480 Real-Time PCR System (System II) (LightCycler® 480 System) mit 96 Kavitäten, Roche-Artikelnummer: 05015278001, und dem Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System, Artikelnummer 4351105 (ABI7500) versehen.

Beim LightCycler® 480 System muss das K-RAS Kit in Verbindung mit der LightCycler® Adapt Software v1.1 für das TheraScreen® K-RAS Mutation Kit CE-IVD (LightCycler® Adapt Software) verwendet werden. Diese Software wurde entwickelt, um die Ausgabe eines positiven oder negativen Amplifikationsplots zu automatisieren. Darüber hinaus berechnet sie eine geeignete Schwelle für die Ermittlung von Ct-Werten. Daraus werden die ΔCt-Werte der Proben berechnet und anschließend mit den 1 %-Cut-off-Werten verglichen. Die Software meldet ein positives oder negatives Mutationsergebnis und ermöglicht eine Analyse und Interpretation der mit dem K-RAS Kit erhaltenen Daten unter Ausschluss jeglicher Subjektivität.

Format des K-RAS Kit

Das K-RAS Kit enthält acht Assays.

- Ein Kontrollassay
- Sieben Mutationsassays

Alle Reaktionsgemische enthalten ein exogenes Kontrollassay (interne Kontrolle) mit der Beschriftung HEX (Erkennung durch den JOE-Detektor auf dem ABI7500). Damit wird überprüft, ob Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können.

Kontrollassay

Das mit FAM gekennzeichnete Kontrollassay dient der Auswertung der gesamten DNA in einer Probe. Dieses Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 4 des K-RAS-Gens.

Bekannte K-RAS-Polymorphien werden aufgrund der Konzeption von Primer und Sonde vermieden.

Mutationsassays

Jedes mit FAM beschriftete Mutationsassay enthält einen Scorpions- und einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen der Wildtyp-DNA und der in einem Echtzeit-PCR-Assay erkannten mutierten DNA.

4. Reagenzien

Dieses K-RAS Kit enthält je nach Größe ausreichend Reagenzien für die qualitative Probenauswertung und die Durchführung der K-RAS-Assays für maximal 20 bzw. 80 Reaktionen.

Kit-Umfang	DxS-Produktcode	Roche Diagnostics-Bestellnummer
20 Reaktionen	KR-21	05366216190
80 Reaktionen	KR-22	05366224190

Wie viele Proben getestet werden können, richtet sich nach der Chargengröße der Proben.

Tabelle 2: Inhalt des K-RAS Kits

Enthaltene Reagenzien	20 Reaktionen Volumen	80 Reaktionen Volumen	Röhrchen
Kontrollreaktionsgemisch	1300 µl	5200 µl	1
12ALA-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	2
12ASP-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	3
12ARG-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	4
12CYS-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	5
12SER-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	6
12VAL-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	7
13ASP-Reaktionsgemisch	650 µl	2600 µl	8
Gemischter Standard	300 µl	1000 µl	9
Taq-DNA-Polymerase	60 µl	240 µl	10

Im K-RAS Kit nicht enthaltene Geräte und Reagenzien

Der Anwender benötigt folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien:

- LightCycler® 480 System oder ABI7500 Real-time PCR System zur Durchführung des Testzyklus gemäß Definition in Kapitel 9, „K-RAS-Mutationsnachweisprotokoll“
- LightCycler® Adapt Software v1.1 von Roche Diagnostics (Katalognr. 05474914001)
- 0,2 ml DNAse-freie PCR-Platten (LightCycler® 480 Instrument Multiwell Plate 96, Katalognummer 04729692 001 oder ABI MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Artikelnummer 4306737, mit MicroAmp Optical Adhesive Film, Artikelnummer 4311971)
- Sterile Röhrchen zum Ansetzen von Master-Mixes
- Spezielle Pipetten zur Erstellung des PCR-Gemischs
- Spezielle Pipetten zum Dispensieren von DNA-Template
- Steriles, nukleasefreies H_20

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- In-vitro-Diagnostikum.
- Das K-RAS Kit ist nicht für das Screening oder die Diagnose von Krebs gleich welcher Art, einschließlich Kolorektalkrebs, vorgesehen. Das Kit soll in Ergänzung zu anderen, gegenwärtig eingesetzten Prognosefaktoren für die Auswahl von Patienten dienen, die auf eine Anti-EGFR-Therapie nicht ansprechen würden.
- Therapieentscheidungen für Krebspatienten dürfen nicht ausschließlich auf dem Mutationsstatus des K-RAS-Gens beruhen. Der Mutationsstatus des Patienten muss zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren von einem Arzt beurteilt werden.
- Der Inhalt des K-RAS Kits kann ohne negative Auswirkungen auf den Assay maximal 8-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die K-RAS Kit-Reagenzien KEINESFALLS mehr als 8-mal einfrieren und wieder auftauen.
- Es ist zu beachten, dass Tumorproben nicht homogen sind und die Daten einer Tumorprobe nicht unbedingt mit anderen Abschnitten desselben Tumors übereinstimmen. Tumorproben können auch nicht tumoröses Gewebe enthalten. Bei DNA aus nicht tumorösem Gewebe ist davon auszugehen, dass es keine der mit dem K-RAS Kit detektierten K-RAS-Mutationen enthält.
- Alle Assays im K-RAS Kit erzeugen kurze PCR-Produkte. Das K-RAS Kit funktioniert jedoch nicht bei stark fragmentierter DNA.
- Die DNA-Auswertung sollte auf Grundlage der PCR erfolgen und kann von der auf optischen Dichtemessungen basierenden Quantifizierung abweichen. Ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch ist enthalten, mit dem vor Gebrauch des K-RAS Kits die Qualität und Quantität der DNA in Proben beurteilt werden kann.
- Die Reagenzien für das K-RAS Kit wurden optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt. Die Verwendung von weniger als 25 µl Reaktionsvolumen wird nicht empfohlen, da dies das Risiko von falsch-negativen Werten erhöht.
- Alle Reagenzien im K-RAS Kit wurden speziell für die Anwendung mit den angegebenen Tests formuliert. Um eine optimale Leistung zu gewährleisten, dürfen die Reagenzien des K-RAS Kits nicht ausgetauscht werden.
- Scorpions-Primer müssen (ebenso wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden und optimale Aktivität und Leistung sicherzustellen.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um die Kontamination von PCR-Reaktionen mit synthetischem Kontrollmaterial zu vermeiden.

Es empfiehlt sich, zum Ansetzen von Reaktionsgemische und zum Hinzufügen von DNA-Template separate, spezielle Pipetten zu verwenden. Die Vorbereitung und Dispensierung der Reaktionsgemische sollte nicht in dem Bereich durchgeführt werden, in dem die Template-Zugabe erfolgt. Die Röhrchen dürfen nach einer PCR-Reaktion keinesfalls geöffnet werden.

- Jedes Assay im K-RAS Kit weist charakteristische Eigenschaften auf. Die Berechnung des Ergebnisses muss mit Bezug auf die korrekten Assayparameter erfolgen (siehe Kapitel „Berichts-/Dateninterpretation“).

- Mutations-Ct-Werte von 38 oder höher müssen als negativ oder unter den Grenzwerten des Kits liegend beurteilt werden.

- Die Assays enthalten zusätzlich zur jeweiligen Reaktion eine exogene Kontrollreaktion (interne Kontrolle) (siehe Kapitel „Technologische Grundlagen“). Wenn beide Assays fehlschlagen, müssen die Daten verworfen werden, da möglicherweise Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Resultaten führen können. Durch Verdünnung der Probe kann die Wirkung der Inhibitoren verringert werden; allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die DNA verdünnt wird.

- Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen für Labors müssen beachtet werden, insbesondere folgende:
  a) Nicht mit dem Mund pipettieren.
  b) In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
  c) Nach der Durchführung des Tests die Hände waschen.

- Nur die im Kit enthaltene *Taq*-Polymerase (*Taq*) verwenden und nicht durch *Taq* aus anderen Kits des gleichen oder eines anderen Typs oder durch *Taq* anderer Hersteller ersetzen.

- Nur die für den jeweiligen Testlauf erforderlichen Reagenzien auftauen. Nicht jedes Mal das gesamte Kit auftauen, so dass die Anzahl der Einfrier-/Auftauzyklen auf ein Minimum beschränkt wird.

Sicherheitsinformationen

Vorsicht: Alle chemischen und biologischen Materialien sind als potenziell gefährlich einzustufen. Proben sind potenziell infektiös und müssen entsprechend gehandhabt werden.

Das K-RAS Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in den einschlägigen Labortechniken ausgebildet wurden. Bei der Arbeit mit den Komponenten dieses K-RAS Kits sind stets ein geeigneter Laborkittel, Einweghandschuhe und eine Schutzbrille zu tragen. Nach dem Gebrauch müssen die Komponenten des K-RAS Kits wie klinischer Abfall entsorgt werden.

6. Lagerung, Haltbarkeit und Transportbedingungen

Lagerung

Der gesamte Inhalt des K-RAS Kits muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -18°C bis -25°C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur aufbewahrt werden. Unnötiges Einfrieren und Auftauen des K-RAS Kit-Inhalts ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Das K-RAS Kit nach dem angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden. Der Inhalt des K-RAS Kits ist bei Aufbewahrung gemäß den empfohlenen Lagerungsbedingungen und in der Originalverpackung bis zum Verfallsdatum haltbar.

Der Inhalt des K-RAS Kits kann ohne negative Auswirkungen auf den Assay maximal 8-mal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die K-RAS Kit-Reagenzien KEINESFALLS mehr als 8-mal einfrieren und wieder auftauen.

Transportbedingungen

Der Inhalt des K-RAS Kits wird auf Trockeneis versandt und sollte beim Empfang immer noch gefroren sein. Wenn das K-RAS Kit beim Empfang nicht gefroren ist, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keinen Packzettel, keine Gebrauchsanleitung oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an die zuständige Roche Diagnostics-Niederlassung. Die Kontaktdaten finden Sie in Kapitel 12, „Technische Unterstützung“.

7. System

Vollständige Anleitungen für die Installation und Bedienung des Echtzeit-PCR-Systems sind dem Benutzerhandbuch des Systems zu entnehmen.

8. Proben

Das Probenmaterial muss humangenomische DNA sein, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten, kolorektalen Tumorproben extrahiert wurde.

Entnahme und Vorbereitung der Proben

1. Probentransport: gemäß Pathologie-Standardverfahren zur Sicherstellung der Probenqualität

2. Empfohlenes Verfahren für die Probenextraktion: DNA-Extraktion mit dem Qiagen QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Katalognummer 56404)

   Das Qiagen-Protokoll ist mit folgenden Abänderungen anzuwenden:
   - FFPE-Gewebe muss auf Objektträger aus Glas aufgebracht werden.
   - Überschüssiges Paraffin muss mit einem frischen sterilen Skalpell um die Gewebeabschnitte herum entfernt werden.

- Das Gewebematerial für jede zu extrahierende Probe mit einem frischen Skalpell in ein Mikrozentrifugenröhrchen streichen.
- Die Proteinase K-Verdauung muss bis zum Abschluss fortgesetzt werden. Dies kann bis zu 48 Stunden dauern.
- Die Proben in 200 µl des ATE-Puffers aus dem Qiagen-Extraktionskit eluieren.

Der Endbenutzer muss alle alternativen Methoden zum Ansetzen der Proben validieren.

3. Lagerung der extrahierten DNA: Vor der Analyse bei -20°C aufbewahren.

Protokoll zur Probenauswertung

Das im K-RAS Kit enthaltene zusätzliche Kontrollassay wird zur Bestimmung der gesamten DNA in einer Probe verwendet. Dieses Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 4 des K-RAS-Gens. Die Proben sollten so angesetzt werden, dass nur das Kontrollassay den gemischten Standard als positive Kontrolle und Wasser als Nicht-Template-Kontrolle (NTC) verwendet. Es ist zu beachten, dass die Proben chargenweise zusammengefasst werden sollten, um die Reagenzien im K-RAS Kit optimal zu nutzen. Alle Versuchsläufe müssen Kontrollen enthalten. Werden die Proben einzeln getestet, hat dies einen höheren Verbrauch an Reagenzien zur Folge und die Anzahl der mit dem K-RAS Kit zu testenden Proben verringert sich.

Protokoll zur Probenauswertung – Plattenanordnung

1. Das Reaktionsgemisch und den gemischten Standard aus dem K-RAS Kit bei Zimmertemperatur auftauen. Nach dem Auftauen jede Lösung durch 10-maliges Umschwenken gründlich mischen, um Salzkonzentrationen zu vermeiden. Ausreichend Gemische für die DNA-Proben, eine Reaktion mit gemischtem Standard und eine Nicht-Template-Kontrolle sowie für zwei (2) zusätzliche Reaktionen anfertigen.

2. Zum Erstellen des Master-Mix sind die in Tabelle 3 angegebenen Mengen an Reagenzien pro Reaktion zu verwenden.

Tabelle 3: Volumina für Kontrollassay-Master-Mix

Assay	Master-Mix	
	Reaktionsgemisch (µl)x1	*Taq* (µl)x1
Kontrollassay	19,8	0,2

3. Die *Taq* oder andere Reaktionsgemische, die *Taq* enthalten, nicht im Vortexer mischen, da das Enzym dadurch inaktiviert werden kann.

4. Vor Gebrauch dafür sorgen, dass die *Taq* auf Raumtemperatur erwärmt ist. Das Fläschchen schwenken, um sicherzustellen, dass sich die gesamte *Taq* am Flaschenboden ansammelt.

Anschließend zum Pipettieren die Pipettenspitze knapp unter die Oberfläche der *Taq* eintauchen, damit die Spitze möglichst nicht mit zu viel *Taq* benetzt wird.

5. Den Master-Mix durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.
6. Sofort 20 µl der Kontroll-Master-Mix in jedes der Reaktionskavitäten geben.
7. Sofort 5 µl der Probe, des gemischten Standards oder Wasser (für die Nicht-Template-Kontrollen) in die Reaktionskavitäten geben.
8. Die Platte muss so angeordnet sein, dass der gemischte Standard in Position A1 und die Nicht-Template-Kontrolle (Wasser) in A2 gegeben wird. Alle anderen benutzten Kavitäten müssen die Proben enthalten.
9. Die PCR-Platte verschließen und kurz schwenken, um die Reagenzien unten in den Kavitäten anzusammeln.
10. Die nachstehenden Anweisungen für die entsprechende Plattform befolgen.

Protokoll zur Probenauswertung – LightCycler® 480 Systemeinrichtung

1. Die Platte sofort in das LightCycler® 480 System einsetzen.
2. Auf das Symbol der LightCycler® 480-Software auf dem Desktop der mit dem System verbundenen Workstation klicken. Den Anmeldevorgang durchführen und auf dem Bildschirm ‘Overview’ die Option ‘New Experiment from Template’ auswählen. Aus der angezeigten Liste der Testlauf-Templates den Eintrag ‘K-RAS LC480II Run Template’ auswählen. Dieses Template verfügt über folgende Parameter:
    1. Das Detektionsformat lautet ‘DxS IVD Assays’.
    2. Das Reaktionsvolumen beträgt 25.
    3. Eine erste Pause bei 95°C für 4 Minuten.
    4. Eine 2-stufige Amplifikation für 45 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und Annealing bei 60°C für eine Minute. Die Fluoreszenzerfassung ist eine Einzelerfassung beim 60°C-Schritt.
3. Auf die Registerkarte ‘Sample Editor’ klicken und unter ‘Step 1: Select Workflow’ das Kontrollkästchen ‘Abs Quant’ aktivieren. Unter ‘Select Filter Combinations’ sicherstellen, dass beide Filter (465-510 nm und 533-580 nm) ausgewählt sind. Die Probennamen unter ‘Step 2’ und ‘Step 3’ einrichten. Die Option ‘Quantification Sample Type’ auf ‘unknown’ setzen. Die Spalte ‘Replicate‘ muss leer bleiben.
4. Auf die Schaltfläche ‘Experiment’ und danach auf die Schaltfläche ‘Start Run’ klicken, um die Analyse zu speichern und den Zyklus zu starten.

5. Nach Abschluss des Laufs auf die Registerkarte ‘Analysis’ klicken und im Fenster ‘Create New Analysis’ die Option ‘Abs Quant/2nd Derivative Max’ auswählen. Die vorgegebenen Einstellungen im Bildschirm ‘Create New Analysis’ übernehmen. Sicherstellen, dass ‘Filter Comb’ auf ‘465-510’ eingestellt ist, und auf die Schaltfläche ‘Calculate’ klicken. In der Tabelle ‘Samples’ werden die Ct-Werte angezeigt.

6. Auf ‘Filter Comb’ klicken und die Filtereinstellung auf 533-580 nm ändern. Auf die Schaltfläche ‘Calculate’ klicken und die Ct-Werte der exogenen Kontrolle der Tabelle ‘Samples’ entnehmen.

Protokoll zur Probenauswertung – ABI7500 Systemeinrichtung

1. Die Platte sofort in das ABI7500 System einsetzen.

2. Auf das Symbol der 7500-Software auf dem Desktop der mit dem System verbundenen Workstation klicken. Eine neue Datei im Dateimenü der 7500 Sequence Detection Software Version 1.4 öffnen.

3. Unter ‘Assay’ die Option ‘Standard Curve (Absolute Quantification)’ auswählen. Unter ‘Run Mode’ die Option ‘Standard 7500’ auswählen.

4. Durch Klicken auf die Schaltfläche ‘Next’ zum Fenster für die Einrichtung des Detektors navigieren. Der Liste der Detektoren einen FAM- und einen JOE-Detektor hinzufügen und die Quencher auf ‘none’ setzen. Wenn diese Detektoren nicht bereits vorhanden sind, auf die Schaltfläche ‘New Detectors’ klicken und einen FAM- und einen JOE-Detektor mit der Quencher-Einstellung ‘none’ einrichten.

5. Die Einstellung ‘Passive Reference’ auf ‘None’ setzen und auf die Schaltfläche ‘Next’ klicken.

6. Die ganze Platte auswählen und die Kontrollkästchen für die FAM- und JOE-Detektoren aktivieren, um sicherzustellen, dass beide Farbstoffe in jeder Kavität überwacht werden. Auf die Schaltfläche ‘Finish’ klicken.

7. Auf der Registerkarte ‘Instrument’ den Zyklus wie in Tabelle 4 angegeben einrichten.

Tabelle 4: ABI7500: Zyklusbedingungen

Temperatur	Zeit	Zyklen	Datenerfassung
Phase 1			
95°C	4 Min.	1	
Phase 2			
95°C	30 Sek.		
60°C	1 Min.	40	FAM, JOE

8. Auf die Schaltfläche ‘Start’ klicken, um die Analyse zu speichern und den Zyklus zu starten.

9. Nach Abschluss des Laufs sicherstellen, dass die passive Referenz im Bildschirm 'Well Inspector' auf 'none' gesetzt ist. Auf der Registerkarte 'Amplification Plot' alle benutzten Kavitäten auswählen und im Listenfeld für den Detektor den Farbstoff 'JOE' auswählen.

10. Das JOE-Signal von jeder Probe überprüfen und mit dem JOE-Signal in der NTC-Kavität vergleichen. Es ist auf Proben zu achten, die im Vergleich zur NTC eine spätere Amplifikationskurve oder fehlgeschlagene Amplifikationskurve bei der exogenen Kontrolle aufweisen.

11. Auf der Registerkarte 'Amplification Plot' alle benutzten Kavitäten auswählen und im Listenfeld für den Detektor den Farbstoff 'FAM' auswählen. Die automatische Grundlinien- und manuelle Ct-Einstellung verwenden und anschließend unter Verwendung der Log-Skala für die Y-Achse die Schwelle manuell auf die Mitte der Exponentialphase setzen (siehe Beschreibung im ABI7500-Benutzerhandbuch).

12. Auf die Schaltfläche 'Analyse' klicken, um die Ct-Werte zu ermitteln.

Interpretation der Probenauswertung

Die Ct-Werte der NTC auswerten, um sicherzustellen, dass keine Kontaminierung vorliegt, die eine positive Amplifikation im FAM-Kanal ergibt (Ct unter 40), oder die exogene Kontrollreaktion im HEX-Kanal nicht fehlgeschlagen ist (kein Ct-Wert), was auf ein Einrichtungsproblem hinweist. Der gemischte Standard müsste auf dem ABI7500 System für den Kontrollassay-Ct (FAM-Kanal) einen Wert von 26-29 und auf dem LightCycler® 480 System einen Wert von ≤ 29 ergeben. Die Daten dürfen nicht verwendet werden, wenn eine dieser beiden Testkontrollen fehlgeschlagen ist.

Kontrollassay-Ct von 29-35: Mit Vorsicht interpretieren, da sehr niedrige Mutationswerte möglicherweise nicht erkannt werden.

Kontrollassay-Ct von 35-38: In diesen Proben sind nur wenig amplifizierbare DNA-Kopien vorhanden und Mutationen werden wahrscheinlich nur sichtbar, wenn die meisten Kopien mutiert sind.

Kontrollassay-Ct von ≥ 38: Probe verwerfen, da DNA nur minimal präsent ist und Mutationen mit dem K-RAS Kit nicht nachgewiesen werden können.

Bei Proben mit einem späten Kontrollassay-Ct ist zu beachten, dass der Ct der exogenen Kontrolle für die Probe mit der exogenen Kontrolle der NTC verglichen werden sollte. Ist die exogene Kontrolle der Probe im Vergleich zur NTC verzögert oder negativ, ist möglicherweise ein Inhibitor vorhanden. Es besteht die Möglichkeit, die Auswirkungen eines Inhibitors durch Verdünnung zu verringern; allerdings wird dadurch auch die DNA verdünnt.

Probenverdünnung: Bei einem Kontroll-Ct von < 24 werden die Mutationsassays überlastet. Proben mit einem Kontroll-Ct von < 24 müssen verdünnt werden.

Beim LightCycler® 480 System ist zu beachten, dass mit der zweiten derivativen Methode ermittelte Ct-Werte geringfügig von denen mit der LightCycler® Adapt Software ermittelten abweichen können. Es empfiehlt sich, konzentrierte Proben auf einen Bereich zwischen > 24 und < 29 zu verdünnen (Ct-Werte auf Basis der 7500 Sequence Detection Software oder LightCycler® 480 Instrument Software), und zwar auf der Grundlage, dass eine Verdünnung von ½ den Ct um 1 erhöht.

9. K-RAS-Mutationsnachweisprotokoll

- **Lesen Sie diese Gebrauchsanweisung aufmerksam durch und machen Sie sich vor dem Gebrauch mit allen Komponenten des K-RAS Kits vertraut.**

Zur effizienten Nutzung des K-RAS Kits sollten die Proben in Chargen mit jeweils 10 Proben aufgeteilt werden (um eine Platte mit 96 Kavitäten zu füllen). Bei kleineren Chargengrößen können weniger Proben mit dem K-RAS Kit getestet werden.

LightCycler® 480 System: Analyseeinrichtung

Die Kontroll- und Mutationsassays müssen für jede DNA-Probe auf denselben PCR-Lauf bezogen analysiert werden, um Variationen zwischen den einzelnen Läufen zu vermeiden.

1. Die Reaktionsgemische und den gemischten Standard aus dem K-RAS Kit bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen jede Lösung durch 10-maliges Umschwenken gründlich mischen, um Salzkonzentrationen zu vermeiden. Genügend Gemische für die DNA-Proben, den gemischten Standard und Nicht-Template-Kontrollen sowie für 2 zusätzliche Reaktionen pro Gemisch anfertigen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Volumina für K-RAS-Master-Mixes

Assay	Master-Mixes			
	Reaktions-gemisch (µl)x1	*Taq* (µl)x1	Reaktionsgemisch (µl) pro Platte (x14)	*Taq* (µl) pro Platte (x14)
Kontrollassay	19,8	0,2	277,2	2,8
Mutations-assays	19,8	0,2	277,2	2,8

2. Die *Taq* oder andere Reaktionsgemische, die *Taq* enthalten, nicht im Vortexer mischen, da das Enzym dadurch inaktiviert werden kann.

3. Vor Gebrauch dafür sorgen, dass die *Taq* auf Raumtemperatur erwärmt ist. Das Fläschchen schwenken, um sicherzustellen, dass sich die gesamte *Taq* am Flaschenboden ansammelt. Anschließend zum Pipettieren die Pipettenspitze knapp unter die Oberfläche der *Taq* eintauchen, damit die Spitze möglichst nicht mit zu viel *Taq* benetzt wird.

4. Die Master-Mixes durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

5. Sofort 20 µl der Master-Mixes in die Reaktionskavitäten füllen.

6. Sofort 5 µl der Probe, des gemischten Standards oder Wasser (für die Nicht-Template-Kontrollen) in die Reaktionskavitäten geben. Jede DNA-Probe muss sowohl mit dem Kontroll- als auch allen Mutations-assays getestet werden. Die Plattenanordnung ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: K-RAS Kit-Plattenanordnung

Anordnung bei 96 Kavitäten												
Assay	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrolle	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
B 12ALA	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
C 12ASP	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
D 12ARG	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
E 12CYS	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
F 12SER	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
G 12VAL	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
H 13ASP	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10

7. Die PCR-Platte verschließen und kurz schwenken, um die Reagenzien unten in den Kavitäten anzusammeln.

8. Die Platte sofort in das LightCycler® 480 System einsetzen.

LightCycler® 480 Systemeinrichtung

1. Auf das Symbol der LightCycler® 480-Software auf dem Desktop der mit dem System verbundenen Workstation klicken. Den Anmeldevorgang durchführen und auf der Seite ‘Overview’ die Option ‘New Experiment from Template’ auswählen.

2. Aus der angezeigten Liste der Test-Templates den Eintrag ‘K-RAS LC480II Run Template’ auswählen (weitere Informationen hierzu siehe Kapitel „Probenauswertung“ für das LightCycler® 480 System).

3. Auf die Registerkarte ‘Sample Editor’ klicken und unter ‘Step 1: Select Workflow’ das Kontrollkästchen ‘Abs Quant’ aktivieren. Unter ‘Select Filter Combinations’ sicherstellen, dass beide Filter (465-510 nm und 533-580 nm) ausgewählt sind. Die Probennamen unter ‘Step 2’ und ‘Step 3’ einrichten. In Spalte 1 muss der Probenname ‘Mixed Standard’ lauten. In Spalte 2 muss der Probenname ‘NTC’ lauten. In die Spalten 3-12 müssen Probennamen eingegeben werden.

Die Namen müssen für alle Kavitäten in Spalte 1 identisch sein. Die Option ‘Quantification Sample Type’ auf ‘unknown’ setzen. Die Spalte ‘Replicate‘ muss leer bleiben, da Replikate von der LightCycler® Adapt Software nicht berücksichtigt werden.

4. Auf die Schaltfläche ‘Experiment’ und danach auf die Schaltfläche ‘Start Run’ klicken, um die Analyse zu speichern und den Zyklus zu starten.

LightCycler® 480 System: Probenanalyse

1. Nach Abschluss des Laufs auf dem LightCycler® 480 System mit Hilfe des Navigatorfensters die Analyse (.ixo-Datei) in ein geeignetes Verzeichnis exportieren, auf das die LightCycler® Adapt Software zugreifen kann.

2. **WICHTIG:** Die LightCycler® Adapt Software ist für den Einsatz auf einem Einzelcomputersystem validiert; der Definition nach ist das eine Control Unit (Workstation) von Roche Diagnostics zur Verwendung mit einem LightCycler® 480 System II. Diese Validierung der LightCycler® Adapt Software gilt derzeit nur für die Control Unit, die ein unabhängiger Computer ist (d. h. nicht in ein Netzwerk eingebunden). Der Einsatz anderer Computer ist untersagt, da sonst eine einwandfreie Funktionsweise der Software nicht gewährleistet werden kann.

3. Die LightCycler® Adapt Software durch Klicken auf das Symbol der LightCycler® Adapt Software auf dem Desktop der Workstation öffnen und den Benutzernamen in das entsprechende Feld eingeben. Dieser Name wird als Berichtsverfasser eingegeben.

4. Im Hauptfenster die Browser-Schaltfläche betätigen und eine einzelne LightCycler® 480-Testdatei auswählen. (Zum Aufheben einer Auswahl muss die Software geschlossen und erneut geöffnet werden.)

5. Einen Berichtstyp auswählen (PDF oder CSV). Bei Auswahl von CSV wird automatisch zusätzlich eine PDF-Version erstellt.

6. Zum Erstellen des Ergebnisberichts die Option ‘Analyse’ wählen. Der Bericht wird automatisch in dem Ordner der Testlaufdatei gespeichert und erhält den gleichen Namen wie die Testlaufdatei.

7. Der Bericht wird automatisch angezeigt.

8. Das Berichtsergebnis wird in der Spalte ‘Mutation Status’ der Tabelle ‘Sample Result’ angezeigt.

LightCycler® Adapt Software: Berichtsinterpretation

1. Der LightCycler® Adapt Software-Bericht enthält allgemeine Informationen über die Analyse.

    1.1. Der Berichtsverfasser ist die Person, die die Software ausgeführt und den Bericht erstellt hat.
    1.2. Datum und Uhrzeit der Analyse werden angegeben.

2. Der Bericht enthält eine Analyseübersicht, in der der Name der Testlaufdatei sowie die Algorithmusdefinitionsdatei und die Algorithmussequenz aufgeführt sind. Die Algorithmusdetails sind vorgegeben und können nicht geändert werden.

3. Im Ergebnisbereich sind der vollständige Name und der Dateipfad der Testlaufdatei des LightCycler® 480 Systems sowie folgende Details aufgeführt:
   3.1. Die Seriennummer des LightCycler® 480 Systems.
   3.2. Instrument Name – Die dem LightCycler® 480 System in der LightCycler® 480-Software zugeordnete Kennung.
   3.3. Run Date – Datum und Uhrzeit des Testlaufs auf dem LightCycler® 480 System.
   3.4. Run Operator – Der Name der Person, die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung bei der LightCycler® 480-Software angemeldet war.
   3.5. Experiment Name – Name der Testlaufdatei.
   3.6. Software Version – Version der auf dem LightCycler® 480 System verwendeten Software.
   3.7. Lot Number – Übernommen aus dem Feld 'Lot No' auf dem Bildschirm für die Analyseeinrichtung in der LightCycler® 480-Software.

4. Die Plattenanordnung wird angegeben, wobei die Probennamen aus dem Bildschirm 'Sample Editor' der LightCycler® 480-Software übernommen werden.

5. In der Übersicht 'Run Summary Result' ist angegeben, ob der Lauf gültig oder ungültig war. Dies richtet sich nach den Testlaufkontrollen in den Spalten 1 und 2.

6. Testlaufkontrollen
   6.1. Die LightCycler® Adapt Software berechnet den ∆Ct-Wert für den gemischten Standard automatisch anhand der folgenden Formel:
   Mutations-Ct – Kontroll-Ct = ∆Ct
   6.2. Die LightCycler® Adapt Software vergleicht die Werte mit den in Tabelle 7 angegebenen erwarteten Werten.

Tabelle 7: LightCycler® Adapt Software: Erwartete ∆Ct-Werte

Assay	Gemischter Standard ∆Ct
12ALA	-0,61
12ASP	-0,61
12ARG	0,34
12CYS	-0,79
12SER	-0,13
12VAL	0,1
13ASP	-0,74

   6.3. Die Ct- und ∆Ct-Werte werden im Bericht ausgegeben.

6.4. Folgende Markierungen/Warnungen werden für die Testlaufkontrollen in den Spalten 1 und 2 angegeben:

Tabelle 8: LightCycler® Adapt Software: Markierungen/Warnungen für die Testlaufkontrollen

Markierung/Warnung	Bedeutung
CT_OUT_OF_RANGE	FAM-Ct für Kontrollassay liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.
EXO_FAIL	Beim gemischten Standard beträgt der exogene Kontroll-Ct < 30 oder ist negativ, wenn das FAM-Ergebnis negativ ist.
DELTA_CT_OUT_OF_RANGE	Mutations-ΔCt-Werte liegen außerhalb des Sollwertbereichs.
EXO_CONTROL_INVALID	Die exogene Kontrollreaktion in einer NTC ist fehlgeschlagen.
TARGET_CHANNEL_INVALID	Für die FAM-Reaktion liegt ein positiver Ct-Wert in einer NTC vor.

6.4.1. Die Bedeutungen der Markierungen/Warnungen werden im Folgenden genauer erläutert:

6.4.1.1. **CT_OUT_OF_RANGE** – Der Kontrollassay für den gemischten Standard muss einen Ct-Wert von 26,60 ± 2 aufweisen. Liegt der Assay außerhalb dieses Bereichs, wird diese Markierung/Warnung für alle Kavitäten mit gemischtem Standard angezeigt, da keine ΔCt-Werte berechnet werden, und der gemischte Standard ist ungültig. Dies deutet auf eine Funktionsstörung des Kontrollassays hin.

6.4.1.2. **EXO_FAIL** – Diese Markierung/Warnung wird angezeigt, wenn der exogene Kontrollassay in einer der Kavitäten mit dem gemischten Standard unter 30 liegt, da dies auf eine PCR-Kontamination in diesem Gemisch hinweisen kann. Schlägt der exogene Kontrollassay fehl, wenn eine FAM-Reaktion in einer der Kavitäten mit dem gemischten Standard fehlschlägt, wird die Markierung/Warnung **EXO_FAIL** ebenfalls angezeigt. Dies bedeutet, dass ein Problem mit diesem Assay vorliegt, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen könnte. Der gemischte Standard ist bereits aufgrund des FAM-Fehlers ungültig.

6.4.1.3. **DELTA_CT_OUT_OF_RANGE** – Wenn die ΔCt-Werte des gemischten Standards um ± 2,00 von den in Tabelle 7 angegebenen Werten abweichen, gibt die Software den Status 'Valid' aus. Wenn der ΔCt-Wert außerhalb des erwarteten Bereichs liegt, ist der Status ungültig und diese Markierung/Warnung wird angezeigt.

Dies bedeutet, dass ein Problem mit einem Assay vorliegt, das zu falschen Ergebnissen führen könnte.

6.4.1.4. **EXO_CONTROL_INVALID** – In den Kavitäten der Nicht-Template-Kontrolle muss der exogene Kontroll-assay ein positives Ergebnis in allen 8 Kavitäten aufweisen (Ct < 41). Bei negativem Ergebnis wird diese Markierung/Warnung angezeigt und der Status wird als ungültig angezeigt. Dies bedeutet, dass ein Problem mit einem Assay vorliegt, das zu falschen Ergebnissen führen könnte.

6.4.1.5. **TARGET_CHANNEL_INVALID** – In den 8 Kavitäten mit der Nicht-Template-Kontrolle muss das FAM-Ergebnis negativ sein (Ct > 38). Jegliche Amplifikation weist auf eine Kontamination hin. Ein positives Ergebnis bewirkt die Anzeige dieser Markierung/ Warnung und macht die Template-Kontrolle ungültig.

6.5. Falls ein ungültiger Status für eine der Kavitäten mit gemischtem Standard oder Nicht-Template-Kontrollen ausgegeben wird, steht in der Übersicht ‘Run Summary Result’ die Angabe ‘Run Invalid’. In der Tabelle ‘Sample Result’ werden Probennamen und Ct-Werte ausgegeben, der Mutationsstatus wird jedoch als ‘invalid’ gekennzeichnet. Der gemischte Standard gibt an, ob alle Assays ordnungsgemäß funktionieren. Wenn dies nicht der Fall ist, kann ein falsch-positives oder falsch-negatives Mutationsergebnis die Folge sein. Die Nicht-Template-Kontrolle gibt an, dass keine Kontamination in den Master-Mixes vorliegt und die exogene Kontrolle wie vorgesehen funktioniert.

6.6. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass in der LightCycler® Adapt Software eine Fehlermeldung angezeigt wird, wenden Sie sich an den technischen Support (siehe Kapitel 12).

7. Probenergebnisse

7.1. Die Tabelle ‘Sample Result’ enthält die aus der LightCycler® 480-Software übernommenen Probennamen und Ct-Werte von Kontrollassays.

7.2. Die LightCycler® 480 Adapt Software berechnet die ∆Ct-Werte und ermittelt auf Grundlage der in Tabelle 9 aufgeführten 1 %-Cut-off-Werte, ob eine Probe mutationspositiv oder -negativ ist.

Tabelle 9: LightCycler® Adapt Software: 1 %-Cut-off-Werte

Assay	1 % Delta-Ct
12ALA	6,25
12ASP	7,72
12ARG	6,83
12CYS	6,95
12SER	8,95
12VAL	6,5
13ASP	9,09

7.3. Falls ein ΔCt-Wert der Mutation einer Probe unter dem entsprechenden 1 %-Cut-off-Wert für ΔCt liegt, wird die Probe als mutationspositiv bezeichnet. Die LightCycler® Adapt Software gibt an, welche Mutation vorliegt, zeigt jedoch nur eine einzelne Mutation an. Wenn es 2 positive ΔCt-Werte gibt, wird der kleinste Wert ausgegeben. Es wird davon ausgegangen, dass der zweite Wert durch Kreuzreaktivität eines Mutationsprimers entsteht, der Bindung und Priming von einer anderen Mutation ausführt. In den seltenen Fällen des Vorliegens einer doppelten Mutation stimmt die klinische Entscheidung mit dem Fall überein, in dem eine einzelne Mutation vorliegt.

7.4. Wenn die ΔCt-Werte der Probe größer als die 1 %-ΔCt-Werte sind, wird die Probe als mutationsnegativ gemeldet (kann eine Mutation enthalten, deren Grad jedoch die Grenzwerte des Kits unterscheidet).

7.5. Markierungen/Warnungen

7.5.1. Die LightCycler® Adapt Software zeigt in der Tabelle ‘Sample Result’ verschiedene Markierungen/Warnungen für die Proben an (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: LightCycler® Adapt Software: Probenmarkierungen/-warnungen

Markierung/Warnung	Bedeutung
REP_DILUTION	Der Kontroll-Ct liegt unter 24.
CONF_LEVEL	Der Kontroll-Ct ist größer als 28,9 und es wird keine Mutation angezeigt.
LIMITED	Der Kontroll-Ct liegt über 35.
EXO_FAIL	Der exogene Kontrollassay ist fehlgeschlagen, wenn die FAM-Reaktion in einer Mutationsreaktion ebenfalls fehlgeschlagen ist **oder** der exogene Kontroll-Ct kleiner als 30 ist.
FAIL	Die Software ist nicht in der Lage, eine Kurve als positiv oder negativ zu bezeichnen.

7.5.2. Die Bedeutungen der Markierungen/Warnungen werden im Folgenden genauer erläutert:

7.5.2.1. **REP_DILUTION** – Kontroll-Ct < 24. Die Assays wurden in Bezug auf ein DNA-Niveau validiert, das einen Kontroll-Ct von 24 oder mehr ergibt.

Wenn eine Probe einen niedrigeren Kontrollassay-Ct ergibt, sollte sie verdünnt werden, damit sie dem zulässigen Wirkungsbereich entspricht.

7.5.2.2. **CONF_LEVEL** – Kontroll-Ct > 28,9. Die Markierung/Warnung **CONF_LEVEL** wird bei einer negativen Kontrolle mit einem Kontroll-Ct von > 28,9 angezeigt. Mutations-Ct-Werte werden als negativ oder außerhalb der Grenzen des Kits eingestuft, wenn Sie größer oder gleich 38 sind. Der Kontroll-Ct muss 28,9 oder weniger betragen, damit angesichts der 1 %-Cut-off-Werte und des Ct-Cut-off-Werts von 38 ausreichend DNA zur Detektion von 1 % Mutation vorhanden ist. Wenn der Kontroll-Ct 28,9 übersteigt und eine Mutation nachgewiesen wird, wird die positive Mutation angezeigt; diese Markierung/Warnung wird nicht ausgegeben, da diese Probe eine konkrete Mutation enthält. Falls jedoch der Kontroll-Ct über 28,9 liegt und die Probe mutationsnegativ zu sein scheint, wird diese Markierung/Warnung angezeigt, um darauf hinzuweisen, dass Mutationen eines geringen Grades möglicherweise übersehen wurden. Je mehr der Kontroll-Ct über 28,9 steigt, desto mehr nimmt die Sensitivität der Mutationsdetektion ab.

7.5.2.3. **LIMITED** – Kontroll-Ct > 35. Damit wird angegeben, dass wenig amplifizierbare DNA vorhanden ist, so dass nur Mutationen mit einem hohen Prozentsatz erkannt werden können. Wenn bei Proben mit der Markierung/Warnung **LIMITED** eine positive Mutation einen Ct von < 38 erhält, wird der Mutationsstatus immer noch als gültig gekennzeichnet und die Mutation wird gemeldet. Das Vorliegen von sehr geringen Mutationen in einer Probe mit negativem Ergebnis und der Markierung/Warnung **LIMITED** kann nicht dementiert werden.

7.5.2.4. **EXO_FAIL** – Die Software überprüft die Amplifikation des exogenen Kontrollassays, um zu bestimmen, ob ein Inhibitor vorhanden sein könnte, der zu einem falsch-negativen Ergebnis führen könnte. Folgende Logik wird angewendet:

a. Die exogene Kontrollreaktion wird nur in den Mutationsreaktionskavitäten und nicht in den Kontroll-assay-Kavitäten ausgewertet; ausgenommen sind die Spalten für gemischten Standard und NTC (siehe Punkt 6) oder exogene Kontrollen mit einem Ct-Wert von < 30.

b. Liegt ein positives Mutationsergebnis vor, aber der exogene Kontrollassay ist in der mutationspositiven Kavität fehlgeschlagen, wird die Markierung/Warnung **EXO_FAIL** nicht angezeigt, weil eine kompetitive Hemmung aus der FAM-Reaktion bestehen könnte. Der Mutationsstatus ist gültig.
c. Wenn ein positives Mutationsergebnis für eine Probe in einer Mutationskavität und ein fehlgeschlagener exogener Kontrollassay in einer anderen Mutationskavität derselben Probe vorliegen, wird die Mutation in der ersten Kavität ausgegeben und das Ergebnis ist gültig. Jedoch wird die Markierung/Warnung **EXO_FAIL** angezeigt. Damit wird angegeben, dass ein Problem mit dem Assay in der Kavität mit dem fehlgeschlagenen exogenen Kontrollassay vorliegt und in dieser Kavität möglicherweise eine Mutation übersehen wurde.
   Es besteht die Möglichkeit, dass die ausgegebene Mutation eher eine Kreuzreaktivität zwischen den Assays als eine echte Mutation darstellt, die übersehen wurde. Der Mutationsstatus in dem Assay, der das positive Mutationsergebnis ausgibt, bleibt gültig, weil eine deutliche Mutation vorhanden ist; die klinische Entscheidung bleibt dieselbe, unabhängig davon, um welche Mutation es sich handelt.
d. Wenn die Probe als negativ eingestuft wird, aber eine exogene Kontrollreaktion in einem der Mutationsassays fehlgeschlagen ist, wird die Markierung/Warnung **EXO_FAIL** angezeigt und der Status ist ungültig. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Mutation übersehen wurde.
e. Wenn der exogene Kontrollassay in einer der 8 Kavitäten einen Ct-Wert von < 30 aufweist, wird die Markierung/Warnung **EXO_FAIL** angezeigt und der Status ist ungültig. Möglicherweise hat in diesem Assay eine PCR-Produktkontamination stattgefunden.
f. Die LightCycler® 480-Testlaufdatei kann überprüft werden, um die mögliche Ursache für fehlgeschlagene exogene Kontrollassays festzustellen. Wenn alle exogenen Kontrollreaktionen in einer Spalte fehlgeschlagen sind, könnte dies auf Inhibitoren hinweisen. Ist der Assay nur in einer Kavität fehlgeschlagen, kann dies auf ein Problem bei der Plattenanordnung hinweisen.

7.5.2.5. **FAIL –** Die Markierung/Warnung **FAIL** wird angezeigt, wenn die Software eine Amplifikationskurve nicht als positiv oder negativ bewerten kann, weil beispielsweise die Kurvenform anomal ist.

7.5.3. Die LightCycler® Adapt Software überprüft, ob der Probenname innerhalb einer Spalte identisch ist, um sicherzustellen, dass die zur Berechnung der ΔCt-Werte verwendeten Mutations- und Kontrollassay-Ct-Werte aus derselben Probe stammen. Die Probennamen werden aus dem LightCycler® 480-Softwarebildschirm 'Sample Editor' in der Testlaufdatei der Analyse übernommen. Falls in der Spalte eine Nichtübereinstimmung vorliegt, wird in der Spalte 'Sample Name' der Tabelle 'Sample Result' **SAMPLE MISMATCH** angezeigt. In der Plattenanordnung zeigt die Software den Probennamen mit dem Hinweis **(MISMATCH)** an. Mögliche Schreibfehler im Namen können in der LightCycler® 480-Testlaufdatei korrigiert und die Daten mit der LightCycler® Adapt Software erneut analysiert werden.

ABI7500: Analyseeinrichtung

Die Kontroll- und Mutationsassays müssen für jede DNA-Probe auf denselben PCR-Lauf bezogen analysiert werden, um Variationen zwischen den einzelnen Läufen zu vermeiden.

1. Die Reaktionsgemische und den gemischten Standard aus dem K-RAS Kit bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen jede Lösung durch 10-maliges Umschwenken gründlich mischen, um Salzkonzentrationen zu vermeiden. Genügend Gemische für die DNA-Proben, den gemischten Standard und Nicht-Template-Kontrollen sowie für 2 zusätzliche Reaktionen pro Gemisch anfertigen (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Volumina für K-RAS-Master-Mixes

Assay	Master-Mixes			
	Reaktions-gemisch (µl)x1	*Taq* (µl)x1	Reaktionsgemisch (µl) pro Platte (x14)	*Taq* (µl) pro Platte (x14)
Kontrollassay	19,8	0,2	277,2	2,8
Mutationsassays	19,8	0,2	277,2	2,8

2. Die *Taq* oder andere Reaktionsgemische, die *Taq* enthalten, nicht im Vortexer mischen, da das Enzym dadurch inaktiviert werden kann.

3. Vor Gebrauch dafür sorgen, dass die *Taq* auf Raumtemperatur erwärmt ist. Das Fläschchen schwenken, um sicherzustellen, dass sich die gesamte *Taq* am Flaschenboden ansammelt. Anschließend zum Pipettieren die Pipettenspitze knapp unter die Oberfläche der *Taq* eintauchen, damit die Spitze möglichst nicht mit zu viel *Taq* benetzt wird.

4. Die Master-Mixes durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

5. Sofort 20 µl der Master-Mixes in die Reaktionskavitäten füllen.

6. Sofort 5 µl der Probe, des gemischten Standards oder Wasser (für die Nicht-Template-Kontrollen) in die Reaktionskavitäten geben.

Jede DNA-Probe muss sowohl mit den Kontroll- als auch den Mutationsassays getestet werden. Die Plattenanordnung ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: ABI7500: K-RAS-Plattenanordnung

Anordnung bei 96 Kavitäten												
Assay	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Kontrolle	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
B 12ALA	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
C 12ASP	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
D 12ARG	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
E 12CYS	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
F 12SER	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
G 12VAL	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
H 13ASP	Gemischter Standard	NTC	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10

7. Die PCR-Platte verschließen und kurz schwenken, um die Reagenzien unten in den Kavitäten anzusammeln.

8. Die Platte sofort in das ABI7500 System einsetzen.

ABI7500: Systemeinrichtung

1. Auf das Symbol der 7500-Software auf dem Desktop der mit dem System verbundenen Workstation klicken. Eine neue Datei im Dateimenü der 7500 Sequence Detection Software Version 1.4 öffnen.

2. Unter ‘Assay’ die Option ‘Standard Curve (Absolute Quantification)’ auswählen. Unter ‘Run Mode’ die Option ‘Standard 7500’ auswählen.

3. Durch Klicken auf die Schaltfläche ‘Next’ zum Fenster für die Einrichtung des Detektors navigieren. Der Liste der Detektoren einen FAM- und einen JOE-Detektor hinzufügen und die Quencher auf ‘none’ setzen. Wenn diese Detektoren nicht bereits vorhanden sind, auf die Schaltfläche ‘New Detectors’ klicken und einen FAM- und einen JOE-Detektor mit der Quencher-Einstellung ‘none’ einrichten.

4. Die Einstellung ‘Passive Reference’ auf ‘None’ setzen und auf die Schaltfläche ‘Next’ klicken.

5. Die ganze Platte auswählen und die Kontrollkästchen für die FAM- und JOE-Detektoren aktivieren, um sicherzustellen, dass beide Farbstoffe in jeder Kavität überwacht werden. Auf die Schaltfläche ‘Finish’ klicken.

6. Auf der Registerkarte ‘Instrument’ den Zyklus wie in Tabelle 13 angegeben einrichten.

Tabelle 13: ABI7500: Zyklusbedingungen

Temperatur	Zeit	Zyklen	Datenerfassung
Phase 1			
95°C	4 Min.	1	
Phase 2			
95°C	30 Sek.		
60°C	1 Min.	40	FAM, JOE

7. Auf die Schaltfläche ‘Start’ klicken, um die Analyse zu speichern und den Zyklus zu starten.

ABI7500: Probenanalyse

1. Sicherstellen, dass die passive Referenz im Bildschirm 'Well Inspector’ auf 'none' gesetzt ist.

2. Überprüfen, dass jede Kavität ein JOE-Signal vom exogenen Kontrollassay abgibt.
   a. Ergibt der exogene Kontrollassay ein positives Resultat, kann die Analyse fortgesetzt werden.
   b. Wenn der exogene Kontrollassay fehlgeschlagen ist, die FAM-Reaktion jedoch stark amplifiziert hat, die Analyse fortsetzen, da die FAM-Reaktion Vorrang vor der exogenen Kontrollreaktion hat.
   c. Wenn sowohl die FAM-Reaktion als auch die exogene Kontrollreaktion fehlgeschlagen sind, müssen die Daten verworfen werden, da Inhibitoren vorliegen können. Diese Inhibitoren könnten falsch-negative Ergebnisse hervorrufen.

3. Auf der Registerkarte ‘Amplification Plot’ alle benutzten Kavitäten auswählen und im Listenfeld für den Detektor den Farbstoff ‘FAM’ auswählen. Die automatische Grundlinien- und manuelle Ct-Einstellung verwenden und anschließend unter Verwendung der Log-Skala für die Y-Achse die Schwelle manuell auf die Mitte der Exponentialphase setzen (siehe Beschreibung im ABI7500-Benutzerhandbuch).

4. Die Daten analysieren und den ΔCt-Wert wie folgt berechnen:
   [Proben-Mutationsassay-Ct] – [Proben-Kontrollassay-Ct] = ΔCt
   Zur besseren Analyse können die Daten in Microsoft Excel exportiert werden.

ABI7500: Dateninterpretation

1. Kontroll-Ct-Werte:
   1.1. Der Kontroll-Ct-Wert muss ≥ 24 sein, um eine Überlastung des Assays zu vermeiden.
   1.2. Kontroll-Ct < 29: Mit dem K-RAS Kit kann bereits 1 % einer Mutation in diesen Proben nachgewiesen werden.

1.3. In Proben mit einem Kontroll-Ct von ≥ 29 können 1 %-Mutationen mit dem Kit zwar nicht erkannt werden, höhere Mutationsgrade werden jedoch erkannt.
1.4. Kontroll-Ct ≥ 35: In der Probe sind nur wenige amplifizierbare DNA-Kopien vorhanden und Mutationen werden wahrscheinlich nur sichtbar, wenn die meisten Kopien mutiert sind.
1.5. Kontroll-Ct ≥ 38: Die DNA ist beschränkt und die Daten dürfen nicht verwendet werden.

2. ΔCt-Werte für gemischten Standard
2.1. Die ΔCt-Werte für gemischten Standard sollten den Angaben in Tabelle 14 entsprechen; es können jedoch aufgrund verschiedener Schwelleneinstellungen auf unterschiedlichen Systemen Abweichungen von ± 2 vorkommen.

Tabelle 14: ABI7500: ΔCt-Werte und 1 %-Cut-off-Werte für gemischten Standard

Assays	Gemischter Standard ΔCt	Zulässiger Bereich für gemischten Standard	1 %-ΔCt der Probe
12ALA	-0,70	-2,70 bis 1,30	6,5
12ASP	-1,04	-3,04 bis 0,96	8
12ARG	-0,02	-2,02 bis 1,98	8
12CYS	-0,98	-2,98 bis 1,02	7
12SER	0,02	-1,98 bis 2,02	9
12VAL	-0,19	-2,19 bis 1,81	6,5
13ASP	-1,12	-3,12 bis 0,88	9

3. ΔCt-Werte der Probe:
3.1. Wenn der ΔCt-Wert der Probe höher als der 1 %-Wert ist (gemäß Angabe in Tabelle 5), dann wird die DNA-Probe als mutationsnegativ oder unter dem Grenzwert des K-RAS Kits liegend klassifiziert.
3.2. Ist der ΔCt-Wert der Probe niedriger als der 1 % Wert, dann wird die DNA-Probe als mutationspositiv klassifiziert.
3.3. Mutations-Ct-Werte von 38 oder höher müssen als negativ oder unter den Grenzwerten des Kits liegend beurteilt werden.

10. Einschränkungen des Tests

Der Kontrollassay-Ct der Probe muss auf dem ABI7500 < 29 und auf dem LightCycler® 480 System 28,9 betragen, um 1 % Mutation in einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA zu erkennen. In Proben mit höheren Kontroll-Ct-Werten können mit Hilfe der Assays 1 %-Mutationen nicht erkannt werden. Die Empfindlichkeit der Mutationsdetektion sinkt mit zunehmendem Anstieg des Kontroll-Ct über diese Werte hinaus.

Der Kontroll-Ct-Wert der Proben-DNA basiert auf der mittels PCR ermittelten Konzentration. Auf optischen Dichtemessungen basierende Werte stimmen nicht mit Ct-Werten von Kontrollassays in fragmentierten DNA-Proben überein. Im Lieferumfang ist ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch enthalten, welches die Auswertung der Ct-Werte der Proben vor dem Gebrauch des Kits ermöglicht.

Wenn eine Probe bei einem Mutations-Ct von ≥ 38 ein mutationspositives Ergebnis ergibt, muss das Assay als negativ oder unter den Grenzwerten des Kits liegend beurteilt werden. Dies erfolgt in der LightCycler® Adapt Software automatisch.

Zwischen Mutationsreaktionen kann eine gewisse Kreuzreaktivität auftreten. Wenn beispielsweise eine 12ALA-Mutation mit hohem Niveau festgestellt wird, liefern auch einige der anderen Mutationsreaktionen ein positives Ergebnis. Die ist auf die ARMS-Primer zurückzuführen, die andere, wenige Basen voneinander entfernte Mutationen erkennen. Bei synthetischem Kontrollmaterial bildet diese Kreuzreaktivität auf dem ABI7500 ein erkennbares Muster, mit dem die echt positiven unter mehreren Signalen bestimmt werden können (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Kreuzreaktivitätsmuster auf dem ABI7500 mit synthetischem Kontrollmaterial

'Ja' gibt das echte Signal an. Zahlen geben die annähernde Zyklenzahl nach dem echten Signal an, nach der ein Kreuzreaktivitätssignal angezeigt werden kann. Werte über 9 Zyklen wurden nicht aufgeführt, da diese sich im negativen Bereich befinden.

Positive Probe	12ALA-Signal	12ASP-Signal	12ARG-Signal	12CYS-Signal	12SER-Signal	12VAL-Signal	13ASP-Signal
12ALA	Ja	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Ja	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Ja	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Ja	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Ja	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Ja	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Ja

Hinweis: Das Kreuzreaktivitätsmuster kann bei DNA-Proben anders ausfallen, beispielweise bei in Paraffin eingebetteten DNA-Proben.

Das K-RAS Kit ist für die Detektion einer Mutation in einer DNA-Probe ausgelegt. Wenn bei einem zweiten Mutationsassay ein positives Ergebnis auftritt, handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine Kreuzreaktivität. In seltenen Fällen wurden jedoch auch Doppelmutanten festgestellt. Wenn das Muster nicht zum Kreuzreaktivitätsmuster passt, sind möglicherweise weitere Untersuchungen erforderlich.

11. Assay-Leistungsmerkmale

Die Beurteilung der Assay-Leistung erfolgte für das K-RAS Kit auf dem ABI7500 und dem LightCycler® 480 System (unter Einsatz der LightCycler® Adapt Software zur Ermittlung der Ct-Werte). Auf jedem System wurden zahlreiche verschiedene Tests durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Tests sind nachfolgend zusammengefasst.

Validierung des 1 %-Cut-off-Werts:

LightCycler® 480 System: Die Detektion von 1 %-Mutationen in einem Hintergrund aus K-RAS-mutationsnegativer Zelllinien-DNA wurde über einen Bereich aus drei verschiedenen Konzentrationen von Zelllinien-DNA bestimmt, um jedem Mutationsassay einen ΔCt-Cut-off-Wert zuzuordnen.

Für jedes Assay wurden 1 % Standards in 3 separaten Testläufen dreifach getestet, und zwar sowohl für den Kontrollassay als auch den Mutationsassay. Das Verfahren wurde von 3 verschiedenen Bedienern wiederholt. Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt.

Die 1 %-ΔCt-Werte wurden anhand aller Kombinationen aus Mutations- und Kontroll-Ct-Werten der Replikate innerhalb eines Testlaufs berechnet.

Die ΔCt-Cut-off-Werte wurden als Durchschnittswert aus allen Testläufen und Konzentrationen festgelegt. Die Ergebnisse dieses Tests sind im Kapitel „Dateninterpretation“ zusammengefasst.

ABI7500: Für jedes Assay wurden 1 % Verdünnungen in 3 separaten Testläufen für 3 Kit-Chargen dreifach getestet, und zwar sowohl für den Kontrollassay als auch den Mutationsassay. Der gemischte Standard wurde auf jeder Platte verwendet, um sicherzustellen, dass die Assays innerhalb der festgelegten Kriterien lagen.

Die 1 %-ΔCt-Werte wurden aus den gemittelten Ct-Werten der Replikate innerhalb eines Testlaufs und einer Charge berechnet. Bei Konzentrationen, in denen alle Replikate einen Ct-Wert ergaben, wurden die ΔCt-Cut-off-Werte als Durchschnittswert (gerundet auf die nächsten 0,5) von allen Chargen, Testläufen und Konzentrationen festgelegt. Die Ergebnisse dieses Tests sind nachfolgend in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: ABI7500: 1 %-Cut-off-Werte – Validierungsergebnisse

Assay	Durchschn.	1 %-ΔCt-Werte
12ALA	6,68	6,5
12ASP	8,2	8
12ARG	8,16	8
12CYS	6,94	7
12SER	8,83	9
12VAL	7,67	7,5*
13ASP	8,89	9

* Der 1 %-Cut-off-Wert für 12Val wurde aufgrund der Breakthrough-Studie auf 6,5 geändert. Siehe Erörterung weiter unten.

ΔCt-Bestimmung des gemischten Standards

LightCycler® 480 System: Die ΔCt-Werte des gemischten Standards sind Mittelwerte aus 50 Testläufen, bei denen der gemischte Standard getestet wurde. Ct-Werte wurden mit der LightCycler® 480 Adapt Software ermittelt. Die erwarteten ΔCt-Werte für den gemischten Standard sind im Kapitel „Dateninterpretation“ aufgeführt.

ABI7500: Die gemischten Standardwerte wurden anhand des Mittelwerts von 422 ΔCt-Werten festgelegt. Die Berechnung erfolgte für zahlreiche verschiedene Kit-Chargen und Testläufe.
Die erwarteten ΔCt-Werte für den gemischten Standard sind im Kapitel „Dateninterpretation“ aufgeführt.

Breakthrough-Validierung: Breakthrough ist definiert als nichtspezifische Amplifikation in den Mutationsassays eines in einer bestimmten Probe vorhandenen Wildtyp-DNA-Target. Dabei entsteht ein messbares Hintergrundrauschen. Der Breakthrough von Wildtyp-DNA wurde für jeden Mutationsassay bewertet. Mit dieser Breakthrough-Studie wurde sichergestellt, dass die zuvor festgestellten 1 %-Cut-off-Werte unter dem Breakthrough-Niveau lagen, was die Anzeige eines falsch-positiven Ergebnisses verhindert.

LightCycler® 480 System: Zehn K-RAS-mutationsnegative Zelllinien-DNA-Proben und fünf FFPE-K-RAS-mutationspositive Proben wurden zweifach auf 5 Platten getestet. Die mutationspositiven Proben waren für eine einzige Mutation positiv und die anderen Mutationen wurden zum Testen des Breakthrough verwendet. Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt und die Berechnung der ΔCt-Werte erfolgte anhand aller Kombinationen von Ct-Werten.

Die Ergebnisse von mutationsnegativen Assays in Zelllinien-DNA- und FFPE-Proben ergaben ΔCt-Werte, die alle über den 1 %-Cut-off-Werten lagen. Das bedeutet, dass die 1 %-Cut-off-Werte stabil sind. In Tabelle 17 sind die schlechtesten Breakthrough-Werte aus den 5 Testläufen dargestellt.

Tabelle 17: Breakthrough-Ergebnisse

Assay	Schlechteste Breakthrough-ΔCt-Werte
12ALA	12,35
12ASP	11,36
12ARG	Kein Breakthrough
12CYS	Kein Breakthrough
12SER	11,74
12VAL	12,29
13ASP	11,29

ABI7500: Der Breakthrough wurde mit Hilfe von gepoolter Zelllinien-DNA aus K-RAS-mutationsnegativen Zelllinien mit 3 verschiedenen DNA-Niveaus beurteilt. Drei identische PCR-Platten wurden getestet. Jede Platte enthielt 3 Reagenzienchargen. Der gemischte Standard wurde als positive Kontrolle eingesetzt. Darüber hinaus wurden positive FFPE-Proben zweifach getestet. Die meisten mutationspositiven Proben sind nur für eine Mutation positiv. Die anderen Mutationsassays können zur Breakthrough-Bewertung verwendet werden. (Allerdings wird eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen einigen Assays und positiven Mutationen erwartet. Diese erzeugt jedoch ein bekanntes Muster.) Ct-Werte und ΔCt-Werte wurden ermittelt und mit den 1 %-Cut-off-Werten verglichen.

Die Daten der Zelllinien-DNA- und FFPE-Proben ergaben ΔCt-Werte, die alle über den 1 %-Cut-off-Werten lagen, mit Ausnahme einer FFPE-Probe, deren ΔCt-Wert knapp unter dem Cut-off-Wert von 7,5 lag (6,84). Da 6,84 innerhalb des Bereichs der ermittelten 1 %-Cut-off-Daten lag, wurde der 1 %-ΔCt-Wert für den 12VAL-Assay von 7,5 auf 6,5 geändert, um die Möglichkeit eines falsch-positiven Resultats auszuschließen. In Tabelle 18 sind die aktuellen 1 %-ΔCt-Werte auf Basis der Breakthrough-Validierungsergebnisse aufgeführt.

Tabelle 18: Breakthrough-Validierungsergebnisse

Assay	1 %-ΔCt-Werte
12ALA	6,5
12ASP	8
12ARG	8
12CYS	7
12SER	9
12VAL	6,5
13ASP	9

Präzisionsvalidierung:

LightCycler® 480 System: Die Präzision wurde mit 1 % synthetischen Kontrollen in 3 verschiedenen Niveaus von K-RAS-mutationsnegativer Zelllinien-DNA getestet. Jede Kontrolle wurde dreifach für den relevanten Assay auf einer Platte getestet, die auch zweifache gemischte Standard- und einfache NTC-Reaktionen enthielten, um sicherzustellen, dass die Reaktionen innerhalb der Spezifikationen lagen. Dieselbe Platte wurde 54-mal über 6 Tage wiederholt. An dieser Matrix aus Testläufen waren 3 Systeme, 3 Reagenzienchargen und 3 Bediener beteiligt.

Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt und die Berechnung der ΔCt-Werte erfolgte anhand aller Kombinationen von Ct-Werten. Alle ΔC-Werte, die den Interquartilbereich dreimal überschritten, wurden als Ausreißer betrachtet und aus der Analyse entfernt. Mittelwerte, Standardfehler und Standardabweichungen wurden berechnet und die Daten wurden nach Kit-Charge, System oder Bediener gruppiert, um die durch diese Variablen hervorgerufene Variation auszuwerten. Die gesamte Wiederholbarkeit der Assays wurde ebenfalls beurteilt.

Die Daten lassen erkennen, dass die Gesamtvariabilität zwischen den Assays niedrig ist und 2 Standardabweichungen über oder unter dem Mittelwert bei dem Assay mit der größten Standardabweichung einen Bereich von ± 1,4 Zyklen vom Mittelwert abdecken.

Der ∆Ct-Mittelwert für jeden Bediener war bei jedem Test maximal 0,15 Zyklen vom gesamten Mittelwert des ganzen Datensatzes entfernt. Die Unterschiede zwischen den Bedienern betrugen nicht mehr als 0,2 Ct, was zeigt, dass die Variation zwischen den Bedienern nicht größer als die Variation innerhalb des gesamten Datensatzes war und die Assays stabil genug sind, um Variabilität zwischen Bedienern zu tolerieren.

Bei jedem Test lag die Differenz der Mittelwerte der einzelnen Systeme und der gesamte Mittelwert bei ± 0,097, wobei die Differenz zwischen den Mittelwerten einzelner Systeme nicht schlechter als ± 0,186 war. Dies zeigt, dass die Variation zwischen Systemen nicht größer als die Variation innerhalb des ganzen Datensatzes war und die Assays stabil genug sind, um Variabilität zwischen Systemen zu tolerieren.

Bei jedem Test betrug die größte Differenz zwischen einer einzelnen Charge und dem gesamten Mittelwert ± 0,195, wobei die schlechteste Differenz zwischen zwei Chargen bei ± 0,38 lag. Dies zeigt, dass die Variation zwischen Chargen nicht größer als die Variation innerhalb des ganzen Datensatzes war und die Assays stabil genug sind, um Variabilität zwischen Chargen zu tolerieren.

ABI7500: Es wurden Analysen durchgeführt, um die Präzisionsleistung jedes Assays zu bestimmen, indem eine PCR-Platte für jede der 3 Reagenzienchargen mit einem Bereich von Proben hoher und niedriger DNA-Konzentration und hohem und niedrigem Mutationsgrad innerhalb eines Tages, an unterschiedlichen Tagen, mit unterschiedlichen Bedienern und Systemen wiederholt wurde.

Zur Bestimmung der Variation zwischen Replikaten, Reagenzienchargen, Testläufen, Testtagen, Systemen und Bedienern wurde eine einfache ANOVA angewendet. Die Nullhypothese lautete, dass die Mittelwerte über die Kategorien hinweg gleich sind. Außerdem wurden Gesamtmittelwert, Standardabweichung und ein prozentualer Variationskoeffizient für die Ct-Werte berechnet.

Keiner der Assays zeigte beim Niveau p = 0,05 eine signifikante Abweichung von der Nullhypothese, gemäß der die Mittelwerte über die Kategorien hinweg gleich sind. Das zeigt, dass die Assays stabil genug sind, um Variationen zwischen Systemen, Bedienern, Chargen, Tagen und Testläufen zu tolerieren.

Genauigkeitsvalidierung:

LightCycler® 480 System: Die Genauigkeit wurde unter Verwendung von 92 FFPE-Proben und 28 mutationspositiven Zelllinien-Verdünnungen bewertet.

Diese wurden mit dem K-RAS Kit getestet und außerdem mit der Sanger-Sequenzierung sequenziert. Der Vergleich der K-RAS-Mutationswerte zwischen den beiden Methoden ergab 18 diskrepante Ergebnisse (5 FFPE- und 13 Zelllinienproben), wobei die Sequenzierung ein negatives Resultat angab, die Probe bei Verwendung des DxS-Assays jedoch positiv war. Zur Bestätigung, ob in diesen 18 Proben eine Mutation vorliegt, wurde jeweils die Region um die Mutationen herum geklont. Das Vorliegen eines mutationspositiven Klons diente der Auflösung der Diskrepanz.

ABI7500: Die Genauigkeit wurde unter Verwendung synthetischer Kontrollen überprüft, die in 2 Konzentrationen von K-RAS-mutationsnegativer Zelllinien-DNA verdünnt wurden, um 3 unterschiedliche Prozentsätze Mutation zu erhalten, die sowohl positive als auch negative Mutationsniveaus abdeckten. Für drei identische Platten, die jeweils 3 Reagenzienchargen enthielten, wurde für jede Mutation ein Testlauf durchgeführt. Die Mutationsniveaus 25 %, 5 % und 0,5 % wurden getestet. (Die 25 %- und 5 %-Proben sollten ein mutationspositives (∆Ct unter den 1 %-Cut-off-Werten) und die 0,5 %-Probe ein mutationsnegatives Resultat ergeben (∆Ct über den 1 %-Cut-off-Werten).) Die Ergebniszusammenfassung ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: ABI7500: Ergebnisse der Genauigkeitsvalidierung

Assay	25 %	5 %	0,5 %
Assay	100 %	100 %	94 %
12ALA	100 %	100 %	100 %
12ASP	100 %	100 %	100 %
12ARG	100 %	100 %	100 %
12CYS	100 %	100 %	100 %
12SER	100 %	100 %	100 %
12VAL	100 %	100 %	100 %
13ASP	100 %	100 %	100 %

Die geringere Genauigkeit beim 12ALA-Assay ist auf die Variation zwischen Replikaten bei einem DNA-Niveau zurückzuführen.

Linearitätsvalidierung:

LightCycler® 480 System: Die Linearität wurde mit synthetischen Standards mit einem Mutationsniveau von 100 %, 1 % und 0 % für jeden Assay bewertet. Bei jedem Mutationsprozentsatz wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um das Mutationsniveau beizubehalten, aber die DNA-Gesamtmenge zu verringern. Durch dreifache Ausführung jeder Verdünnung auf 3 Replikatplatten für den Kontrollassay und den relevanten Mutationsassay wurden Standardkurven erstellt. Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt.

Für jede Mutation wurde ein Diagramm erstellt (Daten nicht gezeigt), in dem der Kontrollassay-Ct und der Mutationsassay-Ct gegeneinander aufgetragen und eine Regression für jedes Mutationsniveau vorgenommen wurde. Die 95 %-Konfidenzintervalle wurde ebenfalls für jedes Mutationsniveau aufgetragen.

Aus den 0 %-Tests wurden keine Mutations-Ct-Werte gewonnen. Die 100 %- und 1 %-Diagramme haben gezeigt, dass deutliche Unterschiede zwischen den Datensätzen bestanden und die Kurvensteigungen im Wesentlichen äquivalent war, was auf eine ähnliche Amplifikationseffizenz über mehrere Mutationskonzentrationen hinweg schließen lässt.

ABI7500: Diese Studie beurteilte über mehrere DNA-Konzentrationen hinweg den Wirkungsgrad der einzelnen Mutationsassays in einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA und in Wasser. Jeder Mutationsassay müsste eine Effizienz von 90 % bis 110 % (100 % ± 10 %) aufweisen.

Standardkurven wurden mit einer 5-fachen Verdünnungsreihe eingerichtet und eine PCR-Platte mit drei Chargen der Kit-Reagenzien wurde für jeden Assay durchlaufen. Die 100 %-Mutationsstandards wurden bei jedem der Mutationsassays durch Verdünnung in Wasser mit 50 ng, 10 ng, 2 ng und 0,4 ng DNA getestet. Außerdem wurden die Mutationsassays mit einer 5-fachen Verdünnungsreihe in 10 ng/µl Zelllinien-DNA getestet, um den Breakthrough-Effekt zu bewerten.

Anhand der Versuchsdaten wurde für jeden Mutationsassay eine Standardkurve generiert. Die Berechnung der PCR-Effizienz erfolgte mit Hilfe der folgenden Gleichung:

$$100((10^{-1/\text{Steigung}})-1)$$

Das höhere Breakthrough-Niveau bei den 10 ng/µl-Zelllinien-Verdünnungen ergab Effizienzwerte von über 100 %.

Außerdem wurden die Gesamtwirkungsgrade quer über die Reagenzienchargen berechnet. Alle Werte waren ähnlich und lagen innerhalb von 10 % der Effizienz des Kontrollassays. Parallele Standardkurven zwischen den Kontrollassays und Mutationsassays belegen, dass die ΔCt-Analysemethode geeignet ist.

Die Linearität blieb im Bereich von 0,4 ng bis 50 ng DNA stets akzeptabel.

Validierung der Kreuzreaktivität:

LightCycler® 480 System: Es wurde keine Validierung der Kreuzreaktivität vorgenommen, da die LightCycler® Adapt Software nur eine einzelne Mutation mit dem kleinsten ΔCt-Wert ausgibt.

ABI7500: Da alle vom K-RAS Kit erkannten Mutationen innerhalb eines Bereichs von 5 Basenpaaren auftreten, ist zu erwarten, dass eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen den Primern auftritt. Mit dieser Studie wurde das Kreuzreaktivitätsmuster des K-RAS Kits bestimmt.

Die Tests wurden unter Verwendung von synthetischen Mutationskontrollen durchgeführt, um zu ermitteln, wie viele Zyklen nach einem echten positiven Kreuzreaktivitätssignal erkannt werden können. Jedes Mutationsreaktionsgemisch wurde mit sechs Replikaten der sieben einzelnen 100 %-Mutationskontrollen getestet. Darüber hinaus wurde jede Kontrolle mit dem passenden Reaktionsgemisch und allen anderen Reaktionsgemischen im gleichen Testlauf untersucht.

Das Kreuzreaktivitätsmuster wurde durch Berechnung des Unterschieds zwischen dem tatsächlichen Amplifikations-Ct-Wert von der angeglichenen Kassette und dem Kreuzreaktivitätssignal jedes anderen Primers ermittelt.

Das erwartete Kreuzreaktivitätsmuster ist nachfolgend in Tabelle 20 zu sehen. Es hat sich gezeigt, dass das Kreuzreaktivitätsmuster konsistent ist und dem Anwender das Ablesen eines Amplifikationsmusters ermöglicht, um das korrekte Assay-Ergebnis zu erhalten, wenn mehr als ein Assay ein positives Resultat ergibt. Die Zahlen in den einzelnen Zellen geben die annähernde Zyklenzahl nach der Detektion des echten positiven Signals an, nach der ein Kreuzreaktivitätssignal angezeigt werden kann. Werte über 9 Zyklen wurden nicht übernommen, weil diese als mutationsnegative Ergebnisse klassifiziert werden.

Tabelle 20: ABI7500: Kreuzreaktivität – Validierungsergebnisse

Positive Probe	12ALA-Signal	12ASP-Signal	12ARG-Signal	12CYS-Signal	12SER-Signal	12Val-Signal	13ASP-Signal
12ALA	Ja	9	-	6	3	6	-
12ASP	9	Ja	-	-	-	-	-
12ARG	-	-	Ja	-	-	-	-
12CYS	-	7	4	Ja	-	-	-
12SER	9	6	9	-	Ja	-	8
12VAL	4	-	-	-	-	Ja	-
13ASP	-	-	-	-	-	-	Ja

Validierung der Zyklustoleranz:

LightCycler® 480 System: Mit diesen Studien wurde die Toleranz der Mutationsassays für Abweichungen der Zyklustemperatur ermittelt. Da die Annealing-Temperatur die maßgeblichste Temperatur ist, die die Leistung des Assays beeinflusst, war die Annealing-Temperatur der Parameter, der variiert wurde.

Die Zyklustoleranz wurde auf 3 verschiedenen DNA-Niveaus unter Verwendung von 1 % synthetischen Standards getestet. Diese Proben wurden für jede Mutation dreifach zusammen mit zweifachen gemischten Standards und einfachen NTC-Reaktionen ausgeführt, um sicherzustellen, dass die Assays innerhalb der Spezifikationen lagen.

Jede Platte wurde bei einer Annealing-Temperatur von 59°C, 60°C und 61°C getestet. 60°C ist die optimale Temperatur für die Ausführung des Assays, doch aufgrund der Variation zwischen PCR-Blöcken muss der Assay über den angegebenen Bereich hinweg stabil sein. Jede Platte wurde bei jeder Temperatur dreifach getestet. Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt und die Berechnung der ΔCt-Werte erfolgte anhand aller Kombinationen von Kontroll- und Mutations-Ct-Werten für jede Probe.

Alle Assays erfüllten das Akzeptanzkriterium, gemäß dem die Werte bei 59°C und 61°C sich nicht von dem Mittelwert bei 60°C ± der Standardabweichung bei 60°C unterscheiden dürfen. Das bedeutet, dass die Assays stabil genug sind, um eine Abweichung der Annealing-Temperatur von 1°C zu tolerieren.

ABI7500: Drei identische PCR-Platten, die jeweils alle 3 Reagenzienchargen des Kits enthielten, wurden bei jeder Annealing-Temperatur getestet. Der gemischte Standard sowie 50 ng gepoolter mutationsnegativer Zelllinien-DNA wurden getestet. Da 60°C die empfohlene Annealing-Temperatur ist, wurden die Platten bei 58°C, 60°C und 62°C getestet. Sind die Assays ausreichend stabil für Versuchstemperaturen, dürften die ΔCt-Werte des gemischten Standards ± 1,5 von den Sollwerten für den gemischten Standard abweichen und die ΔCt-Werte der gepoolten Zelllinien-DNA müsste über den 1 %-Cut-off-Werten liegen.

12ASP zeigte die größte Anfälligkeit für Temperaturvariationen. Jedoch war das Verhalten der Assays allen 3 Temperaturen akzeptabel, was zeigt, dass die Assays bei Ausführung mit 2°C über oder unter der optimalen Temperatur stabil sind.

Validierung der Taq-Toleranz:

LightCycler® 480 System: Bei diesen Studien wurde die Toleranz der Mutationsassays gegenüber Abweichungen des *Taq*-Polymerase-Niveaus ermittelt. Dies ist eine potenzielle Quelle für vom Anwender verursachte Abweichungen, da die *Taq* vom Anwender hinzugefügt wird. Die Toleranz der Assays in Bezug auf verschiedene *Taq*-Niveaus wurde mit 1 % synthetischen Standards in 3 verschiedenen DNA-Niveaus bewertet. Jede Probe wurde dreifach bei einem hohen, normalen und niedrigen *Taq*-Niveau getestet (hoch bedeutet 20 % *Taq* mehr, niedrig bedeutet 20 % *Taq* weniger als normalerweise). Außerdem wurden zweifache gemischte Standard- und einfache NTC-Reaktionen ausgeführt, um sicherzustellen, dass die Assays innerhalb der Spezifikationen lagen. Für jede Platte wurden dreifache Testläufe durchgeführt und es wurden 3 verschiedene *Taq*-Chargen getestet.

Ct-Werte wurden mit der LightCycler® Adapt Software ermittelt und die Berechnung der ΔCt-Werte erfolgte anhand aller Kombinationen der Ct-Werte von Replikaten auf einer Platte.

Alle Assays erfüllten das Akzeptanzkriterium, gemäß dem die Mittelwerte der hohen und niedrigen *Taq*-Proben sich von dem Mittelwert des normalen *Taq*-Niveaus nicht um mehr als eine (1) Standardabweichung von den normalen *Taq*-Daten unterscheiden dürfen.

ABI7500: Mit einer Menge an *Taq*-Polymerase von +10 % und -10 % von der empfohlenen Menge wurden drei identische PCR-Platten, die jeweils 3 Reagenzienchargen enthielten, für jeden Mutationsassay getestet. Außerdem wurde ein Test mit der empfohlenen Menge durchgeführt. Der gemischte Standard wurde ebenso getestet wie 1 %-Standards in DNA mit zwei verschiedenen Niveaus und in 50 ng mutationsnegativer Zelllinien-DNA. Die Assaydaten wurden mit Hilfe der mittleren Abweichung, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten analysiert.

Die Ergebnisse zeigten geringe Variationen (äquivalente Standard-abweichung zwischen Assays, Variationskoeffizient < 10 %) in den Assay-Resultaten, wenn das *Taq*-Niveau um ± 10 % verändert wurde. Das bedeutet, dass die Assays Abweichungen der *Taq*-Polymerase-Niveaus von bis zu 10 % tolerieren könnten.

12. Technische Unterstützung

Technische Unterstützung und weitere Informationen sind über den zuständigen Roche-Vertriebshändler zu beziehen. Kapitel 13 enthält eine Liste mit den Kontaktdaten der Hauptdistributoren von Roche.

13. Hersteller- und Händlerangaben

	DxS Limited 48 Grafton Street, Manchester M13 9XX, Großbritannien		
D Distributed by	Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA Ein Unternehmen der Roche-Gruppe		
GROSS-BRITANNIEN	Roche Diagnostics Charles Avenue Burgess Hill, West Sussex, Großbritannien RH15 9RY	**DEUTSCHLAND**	Roche Diagnostics GmbH Sandhoferstr. 116 Abt. VM-G Mannheim, D-68298
FRANK-REICH	Roche Diagnostics S.A. 2 Avenue du Vercors BP 59, Meylan Cedex, 38240	**SCHWEIZ**	Roche Diagnostics (Schweiz) AG Industriestr. 7 Rotkreuz, CH-6343
SPANIEN	Roche Diagnostics S.L. Av. de la Generalitat, s/n Sant Cugat del Valles Barcelona, E-08190	**ITALIEN**	Roche Diagnostics – Italy V. le G.B. Stucchi 110 Monza (MI), I-20052

Wenn Sie dieses Kit in einem Land erworben haben, das in der Adressliste der Roche Diagnostics-Niederlassungen oben nicht aufgeführt ist, wenden Sie sich bitte an die Roche Diagnostics GmbH in Mannheim unter der unten aufgeführten Adresse.

HAUPTVERTRIEBSZENTRUM	Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Straße 116 68305 Mannheim

14. Datum der letzten Überarbeitung

Datum der letzten Version: Februar 2009

Änderungsübersicht: Geänderter Wert in den Tabellen 5 und 11.

15. Literatur

1. R.A. Hilger, M.E. Scheulen, D. Strumberg. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer. Onkologie 25: 511-518.
2. Pavan Bachireddy, Pavan K. Bendapudi, Dean W. Felsher. (2005). Getting at MYC through RAS. Clin Cancer Res 11(12):4278-4281.
3. Sae-Won Han, Tae-You Kim, Yoon Kyung Jeon, Pil Gyu Hwang, Seock-Ah Im, Kyung-Hun Lee, Jee Hyun Kim, Dong-Wan Kim, Dae Seog Heo, Noe Kyeong Kim, Doo Hyun Chung, Yung-Jue Bang. (2006). Optimization of Patient Selection for Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer by combined analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation, K-ras Mutation, and AKT Phosphorylation. Clin Cancer Res 12(8):2538-2544.
4. William Pao, Theresa Y. Wang, Gregory J. Riely, Vincent A. Miller, Qiulu Pan, Marc Ladanyi, Maureen SF. Zakowski, Robert T. Heelan, Mark G. Kris, Harold E. Varmus. (2005). KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. PloS Medicine 2(1):57-61.
5. Astrid Lievre, Jean-Baptiste Bachet, Delphine Le Corre, Valerie Boige, Bruno Landi, Jean-Francois Cote, Gorana Tomasic, Christophe Penna, Michel Ducreux, Philippe Rougier, Frederique Penault-Llorca, Pierre Laurent-Puig. (2006). KRAS Mutation Status is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. Cancer Res 66 (8): 3992-3995.
6. Silvia Benvenuti, Andrea Sartore-Bianchi, Federica Di Nicolantonio, Carlo Zanon, Mauro Moroni, Silvio Veronese, Salvatore Siena, Alberto Bardelli. (2007). Cancer Res 67 (6): 2643-2648.
7. W. De Roock, J. De Schutter, G. De Hertogh, M. Jannsens, B. Biesmans, N. Personeni, K. Geboes, C. Verslyp, E. Van Cutsem, S. Tejpar. (2007). Journal of Clinical Oncology 25 (18S): 4132.
8. G. Finocchiaro, F. Cappuzzo, P.A. Janne, K. Bencardino, C. Carnaghi, W.A. Franklin, M. Roncalli, L. Crino, A. Santoro, M. Varella-Garcia. (2007). Journal of Clinical Oncology 25 (18S): 4021.
9. F. Di Fiore, F. Blanchard, F. Charbonnier, F. Le Pessot, A. Lamy, M.P. Galais, L. Bastit, A. Killian, R. Sesboue, J.J. Tuech, A.M. Queuniet, B. Paillot, J.C. Sabourin, F. Michot, P. Michel, T. Frebourg (2007). British Journal of Cancer 96: 1166-1169.
10. Shirin Khambata-Ford, Christopher R. Garrett, Neal J. Meropol, Mark Basik, Christopher T. Harbison, Shujian Wu, Tai W. Wong, Xin Huang, Chris H. Takimoto, Andrew K. Godwin, Benjamin R. Tan, Smitha S. Krishnamurthi, Howard A. Burris III, Elizabeth A. Poplin, Manuel Hidalgo, Jose Baselga, Edwin A. Clark, David J. Mauro. (2007). Journal of Clinical Oncology 25(22): 3230-3237.
11. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C et al. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) Nucleic Acids Res. 17 (7): 2503-16.
12. Whitcombe, D., Theaker J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotech 17: 804-807.

13. Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T. (2000). Mode of Action and Application of Scorpion Primers to Mutation Detection. Nucleic Acids Research 28(19): 3752-3761
14. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol. 2007, Nov. 12.
15. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 2006;66:3992-5.
16. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2008;26:374-9.
17. C. Bokemeyer et al., K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. J Clin Oncol 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4000)
18. E. Van Cutsem et al., K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. J Clin Oncol 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 2)
19. S. Tejpar et al., Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). J Clin Oncol 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 4001).
20. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008. "KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care". Christos Karapetis et al.
21. Rafael G. Amado, Michael Wolf, Marc Peeters, Eric Van Cutsem, Salvatore Siena, Daniel J. Freeman, Todd Juan, Robert Sikorski, Sid Suggs, Robert Radinsky, Scott D. Patterson and David D, Chang. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 1626-1634.

Hinweise für den Käufer

Weder dieses Produkt, das TheraScreen® K-RAS Mutation Kit, noch zugehörige Komponenten dürfen ohne die schriftliche Genehmigung von DxS Limited weiterverkauft oder anderweitig zum Wiederverkauf weitergegeben oder modifiziert werden.

TheraScreen® und Scorpions® sind eingetragene Markenzeichen von DxS Limited.

ARMS® ist ein eingetragenes Markenzeichen von AstraZeneca UK Limited.

LIGHTCYCLER und ROCHE sind Markenzeichen von Roche.

ABI7500 ist ein Markenzeichen von Applied BioSystems.

Dieses Produkt ist ein mit dem CE-Zeichen versehenes Diagnostikum, das der Richtlinie 98/79/EG der Europäischen Union über *In-vitro*-Diagnostika entspricht.

Mit dem Kauf dieses Produkts wird eine beschränkte und nicht übertragbare Lizenz für die Verwendung von ARMS®- und Scorpions®-Technologien ausschließlich für die *In-vitro*-Diagnostik erworben.

ARMS® ist durch die US-Patente 5,595,890 und EP 332435 und Scorpions® durch die US-Patente 6,326,145 und EP1088102 geschützt.

Die Informationen in diesem Dokument können geändert werden. DxS übernimmt keine Haftung für mögliche Fehler in diesem Dokument. DxS Limited haftet keinesfalls für Ansprüche, die im Zusammenhang mit oder durch die Verwendung dieses Produkts entstehen, ganz gleich, ob vertraglich, durch unerlaubte Handlung (einschließlich Fahrlässigkeit) oder auf andere Weise. Durch keine Aussage in diesem Dokument wird Haftung ausgeschlossen oder beschränkt, deren Ausschluss oder Beschränkung durch DxS Limited ungesetzlich wäre.

© Copyright 2009. DxS Limited. Alle Rechte vorbehalten.

DxS Limited
48 Grafton Street
Manchester
M13 9XX
UK
www.dxsdiagnostics.com

CE